

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

**Материалы**  
**Всероссийской молодежной гидробиологической конференции**

**«ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ  
СОВРЕМЕННОЙ ГИДРОБИОЛОГИИ»**

**Борок, 2016**

Соломонова Е.С., Акимов А.И., 2014. Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста и освещённости // Морской экологический журнал. Т. 1. С.73–81.

Соломонова Е.С., Муханов В.С., 2011. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia sp.* помощью проточной цитометрии // Морской экологический журнал. Т. 10. № 4. С. 67–72.

УДК 574.23/24

Е.С. Соломонова, А.И. Акимов, Н.Ю. Шоман

ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь  
e-mail: solomonov83@mail.ru

### **Влияния света и температуры на коэффициент переменной флуоресценции и FDA активность, их сопоставление с ростовыми характеристиками, внутриклеточным содержанием хлорофилла на примере водоросли *Phaeodactylum tricornutum***

**Резюме.** Исследовано влияние света и температуры на коэффициент переменной флуоресценции, FDA<sub>п</sub> активность, удельную скорость роста и внутриклеточное содержание хлорофилла диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897). Получено, что в широком диапазоне освещенности и температуры коэффициент переменной флуоресценции и FDA<sub>п</sub> активность сохраняли высокие значения, в этих пределах интенсивность света и температура не являются маскирующими или препятствующими факторами для применения методов в практике гидробиологических исследований. При экстремально высокой освещенности (выше 800 мкЕ м<sup>-2</sup>) и температуры (28°C) наблюдается падение показателей переменной флуоресценции FDA<sub>п</sub> активности, что связано со снижением функционального состояния исследуемых видов водорослей, остановки их роста, и непосредственной гибели клеток.

В морской гидробиологии, а также в исследованиях по интенсивному культивированию микроводорослей, все чаще начинают применяться экспресс методы оценки функционального состояния водорослей, их продукционного потенциала под влиянием внешних условий, в том числе, в связи с антропогенными факторами среды. Такими методами являются, в частности, применение коэффициента переменной флуоресценции (К), характеризующий эффективность переноса и утилизацию энергии в первичных фотохимических процессах (Маторин, Алексеев, 2013), и FDA анализ связанный с активностью ферментов группы эстераз, катализирующих реакции гидролиза сложноэфирных связей (Jochem, 1999). Данный параметр (FDA<sub>п</sub>) предложен нами ранее, как интегральный показатель метаболической активности клеток, реализуемый путем окраски суспензии клеток водорослей витальным красителем диацетат флуоресцеинном (Соломонова, Акимов, 2012).

Вместе с тем реализация этих методов осуществляется на фоне различных уровней светового и температурного факторов, роль которых сама по себе велика.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния света и температуры на параметры коэффициента переменной флуоресценции (К) и FDA<sub>п</sub>, их сопоставление с ростовыми характеристиками, внутриклеточным содержанием хлорофилла на примере водоросли *Phaeodactylum tricornutum* в условиях обеспеченности биогенными элементами (среда f/2).

*Влияние световых условий.* В диапазоне интенсивностей от 0.7 до 200 мкЕ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> (примерно 1.5 раза превышала насыщающую освещенность скорости роста *Phaeodactylum tricornutum*) наблюдались высокие устойчивые значения показателя переменной флуоресценции (0.63-0.7), которые были близки максимальным значениям этого параметра приводимого в литературе для фитопланктона (так и в культурах) вегетирующего в

оптимальных условиях (до 0.8).  $FDA_{fl}$  активность также не зависела от световых условий выращивания в этих пределах. Отношение  $C/X_{cl}$  увеличивалось от 25 до 40. Повышение освещенности от 200 до 600  $мкЕ\ м^{-2}\ с^{-1}$  приводило к снижению значений коэффициента переменной флуоресценции до значений 0.45-0.55, повышению отношения  $C/X_{cl}$  до 120, что однако не было сопряжено со значительным падением скорости роста и было полностью обратимым при уменьшении интенсивности света. Индекс ферментативной активности ( $FDA_{fl}$ ) оставался высоким (600-800 отн. ед.), не снижался до значений освещенности 800  $мкЕ\ м^{-2}\ с^{-1}$ . При освещенностях выше 800  $мкЕ\ м^{-2}\ с^{-1}$  наблюдалось быстрое снижение величины  $K$  до 0.2-0.3,  $FDA_{fl}$  активность падала в 2-3 раза. Отношение  $C/X_{cl}$  резко возрастало до 300-500 (снижении внутриклеточной концентрации хлорофилла) при остановки роста. При пролонгированном воздействии интенсивности света выше 800  $мкЕ\ м^{-2}\ с^{-1}$  наблюдался лизис культуры.

**Влияние температурных условий.** Температурная зависимости скорости роста в диапазоне 5-22°C имела линейный характер, при коэффициенте связи температура – скорость роста водорослей 0.11  $μ/°C$ . Температурный оптимум для *Phaeodactylum tricornutum* составил 20-26°C. В этом температурном диапазоне сохранялись высокие значения коэффициента переменной флуоресценции и  $FDA_{fl}$  активности, низкотемпературное снижение внутриклеточного хлорофилла при 6 °C составляло около 30% относительно содержания при 20°C. Уменьшение температуры выращивания до 3°C приводило к остановке роста (меньше 0.05 дел.сут<sup>-1</sup>), снижению квантовой эффективности утилизации световой энергии, однако в течении 5 суток эти изменения имели обратимый характер. Отсутствие летальных последствий низкотемпературного ингибирования согласуется с высокими значениями  $FDA_{fl}$  активности, понижение которой, как было показано нами ранее для *Chlorella vulgaris suboblonga*, характеризует степень необратимой потери функциональной активности клеток и гибель культуры (Соломонова, Акимов, 2012).

При температурах больше 28°C происходило прогрессирующее уменьшение скорости роста, увеличение доли неактивных и разрушенных клеток. Используемый в работе цитофлуориметрический анализ позволил отследить динамику уменьшения жизнеспособных клеток, для которых, однако, удельная  $FDA_{fl}$  активность (на клетку) продолжала оставаться относительно высокой, в то время как интегральная падала. Величина параметра  $K$  также быстро снижалась до значений меньше 0.2, что также указывает на низкую долю фотосинтетически активных клеток.

Таким образом, в широком диапазоне световых и температурных условий коэффициент переменной флуоресценции и  $FDA_{fl}$  активность сохраняли стабильно высокие значения, характерные для нелимитированной, экспоненциально растущей культуры. В этих пределах свет и температура не являются маскирующими или мешающими факторами для применения методов в исследовательской практике или мониторинге в природных условиях. При экстремальных значениях света (выше 800  $мкЕ\ м^{-2}$ ) и температуры (28°C) наблюдается падение показателей  $K$  и  $FDA_{fl}$ , что является следствием общего ухудшения состояния водорослей, остановки роста, депигментации и гибели клеток водорослей в этих условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-34-00388 мол\_а (Исследование особенностей метаболической и функциональной активности водорослей в условиях пограничных уровней светового и температурного факторов, на базе использования методов проточной цитометрии и переменной флуоресценции.)

### Список литературы

Маторин Д.Н., Алексеев А.А., 2013. Флуоресценция хлорофилла для биодиагностики растений. Москва-Яркутск: ООО «ПКЦ Альтекс», 2013. 364 с.

Соломонова Е.С., Акимов А.И. 2012. Оценка функционального состояния культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции // Морской экологический журнал. № 4. С. 78–84

Jochem F.J., 1999. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate // Marine biology. V. 135. № 4. P. 721–728.

УДК 597.583.1:595.121

Т.В. Фролова

ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН», пос. Борок, Ярославская область  
e-mail: [bianka28061981@gmail.com](mailto:bianka28061981@gmail.com)

### Влияние заражения цестодой *Proteocephalus cernuae* (Gmelin) на активность пищеварительных ферментов ерша *Gymnocephalus cernuus* (L.)

**Резюме.** Установлено, что заражение ерша цестодами *P. cernuae* влияет на активность протеолитических ферментов его кишечника. Это влияние изменяется в зависимости от размеров цестод, населяющих кишечник. При малой суммарной длине паразитов активность протеиназ снижается, а при большой – повышается. Изменения затрагивают в основном сериновые протеиназы. Существенная доля активности представлена металлопротеиназами, что косвенно может свидетельствовать о большой роли микробиоты в пищеварении ерша. Небольшое изменение доли цистеиновых протеиназ как у не зараженных, так и зараженных цестодами рыб, возможно, указывает на незначительные повреждения кишечника прикрепительными аппаратами цестод.

Влияние цестод сем. Proteocephalidae на активность пищеварительных ферментов их хозяев не изучено, хотя представители этого обширного семейства паразитируют практически у всех видов пресноводных рыб, проявляя разную степень специфичности к хозяевам. Размеры тела этих цестод соответствуют размерам тела хозяев и могут быть как очень крупными (*Glanitaenia osculata*, 74 см, у сома), так и очень мелкими (*Proteocephalus gobiorum*, 3 см, у бычков) (Фрезе, 1965; Chambrier, Scholz, 2016). Паразиты подобных размеров могут оказывать существенное влияние на физиолого-биохимические показатели организма хозяев-рыб.

*Цель исследования* – изучение влияния цестоды *P. cernuae* на активность и спектр протеолитических ферментов ерша.

*Материалы и методы.* Для биохимических анализов была отобрана выборка из 23 ершей. В качестве критерия оценки влияния цестод на активность ферментов использовали суммарную длину червей, находившихся в кишечнике каждой отдельной рыбы. Рыб разделили на три группы: I – контроль, незараженные цестодами рыбы ( $n = 10$ ); II – рыбы, зараженные цестодами с малой суммарной длиной ( $4.15 \pm 0.3$  см;  $n = 6$ ); III – рыбы, зараженные цестодами с большой суммарной длиной ( $11.11 \pm 1.58$  см;  $n = 7$ ). Для II и III групп рыб вычислен коэффициент ДЧ/ДК – отношение суммарной длины червей в каждой из зараженных рыб к длине соответствующего кишечника.

Активность протеиназ в гомогенате кишечника ерша (суммарная активность трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.18) определяли с использованием в качестве субстрата 0.3% азо-казеина, pH 7.5 (Alarcón et al., 2002). Для идентификации различных подклассов протеиназ в гомогенатах использовали следующие ингибиторы в объеме 50 мкл: 1) PMSF – ингибитор сериновых протеиназ; 2) EDTA – ингибитор металлопротеаз и 3) E-64 – ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеиназ.

*Результаты и обсуждение.* В результате проведенных экспериментов установлено, что заражение ерша цестодой *P. cernuae* влияет на активность протеиназ кишечника хозяина. При малой суммарной длине паразитов (группа II) активность протеиназ в кишечнике ерша снижается, а при большой (группа III) – повышается. Снижение протеолитической активности у рыб II группы может быть связано с адсорбцией ферментов хозяина на поверхности цестод